

Ulva ohnoi (Ulvaes, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas AMTI-RAS: Influencia en su desarrollo de las concentraciones de nitrógeno y fósforo del medio de cultivo

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grupo de investigación en Biología Costera (BioCost)

Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA)

Tutor: Javier Cremades Ugarte

Natán Curra Feijóo

A Coruña, 2017



ÍNDICE

1 Resumen.....	1
2 Introducción	2
3 Objetivo	4
4 Material y métodos	4
4.1 Especie de estudio	4
4.2 Determinación de la tasa de crecimiento, la tasa de asimilación y la eficiencia de biofiltración	5
4.3 Determinación de nitratos y fosfatos	6
4.4 Composición química de carbono, nitrógeno, hidrógeno, proteínas y relación carbono/nitrógeno	6
4.5 Medios de cultivo.....	7
4.6 Cultivo <i>stock</i>	7
4.7 Diseño experimental.....	8
4.7.1 Diseño de la experiencia bifactorial	8
4.7.2 Diseño de la experiencia de viabilidad de propágulos	10
4.8 Análisis estadístico	11
5 Resultados	12
5.1 Experiencia bifactorial	12
5.1.1 Tasas de crecimiento	12
5.1.2 Tasa de asimilación (RR) y eficiencia de biofiltración (RE)	13
5.1.3 Composición química de carbono, nitrógeno, hidrogeno, proteínas y relación carbono/nitrógeno	17
5.2 Experiencia de viabilidad de propágulos	17
6 Discusión	19
7 Conclusiones.....	21
8 Referencias bibliográficas	22

1 Resumen

Actualmente el desarrollo de distintas estrategias, como la Acuicultura Multitrófica Integrada en Sistemas de Recirculación de Agua (AMTI-RAS), son esenciales para mitigar el impacto ambiental de la eutrofización de los ecosistemas ocasionado por la masificación e intensificación del sector acuícola. Un pilar fundamental en estos sistemas AMTI-RAS son los cultivos de macroalgas, destacando entre ellos el de las especies de *Ulva* Linnaeus. El presente estudio tiene como objetivo principal conocer la concentración óptima de nitrato y fosfato en las cuales *Ulva ohnoi* presenta una mayor tasa de crecimiento y eficiencia biofiltradora. Esta especie fue seleccionada para su estudio por ser entre las de la Península Ibérica la de mayor potencial para su aplicación como biofiltro en sistemas AMTI-RAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en las tasas de crecimiento existe una relación lineal negativa con el aumento de la concentración de fosfato, una interacción entre esta última y el comportamiento parabólico de la concentración de nitrato y un efecto debido al período concreto en que se realizan las experiencias. Por otro lado, se observó que las tasas de asimilación, la eficiencia de biofiltración, la composición química en carbono, nitrógeno, hidrogeno y proteínas y la relación carbono/nitrógeno de la biomasa final varían en función de la concentración de nitratos y fosfatos del medio. En las mayores concentraciones de nitratos y fosfatos estudiadas se observó una paulatina pérdida de la consistencia de las láminas que concluye con su fragmentación masiva.

Por todo ello se concluye que las mayores tasas de crecimiento se dieron a concentraciones intermedias de nitrato y fosfato y que el exceso de este nutriente ejerce un ligero efecto tóxico, atenuado parcialmente en condiciones óptimas de nitrato. Por todo ello se concluye también que la relación nitrato/fosfato no va a ser un factor limitante para el cultivo de esta especie. Futuras investigaciones deberán concluir las causas de la variación en la tasa de crecimiento entre distintos períodos de cultivo y confirmar la hipótesis de que la fragmentación de los individuos bajo condiciones extremas de nutrientes pueda ser parte de un mecanismo de propagación vegetativa.

2 Introducción

La acuicultura es el sector de producción alimentaria con mayor crecimiento debido a la creciente demanda de pescado y productos pesqueros (FAO, 2016). El rápido crecimiento de la acuicultura intensiva acarrear impactos adversos sobre el medio ambiente, como la eutrofización de los ecosistemas (Troell *et al.*, 1999). La acuicultura, entre otras actividades productivas, está incrementado la concentración de distintos nutrientes en las zonas costeras, provocando un aumento de la eutrofización y a la aparición de “mareas verdes” o “blooms” de fitoplancton que desestabilizan los ecosistemas naturales e interfieren con otras actividades humanas (Troell *et al.*, 1999; Lüning & Pang 2003; Bartoli *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Macchiavello & Bulboa 2014). Por ello es crucial aplicar nuevas estrategias como los sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI) para lograr que la industria acuícola sea, tanto ambiental como socioeconómicamente, sostenible (Hernández *et al.*, 2005; Nobre *et al.*, 2010; Guerrero & Cremades 2012). Por lo tanto, el desarrollo de una acuicultura eficiente es un factor fundamental para asegurar el futuro de esta industria (Neori *et al.*, 2004), siendo fundamental aplicar mejoras biotecnológicas que mitiguen los efectos negativos de la acuicultura intensiva (Troell *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2016).

En los ecosistemas marinos y dulceacuícolas los protistas autótrofos (algas) son uno de los mayores bioacumuladores de nutrientes inorgánicos (principalmente nitratos y fosfatos) causantes de la eutrofización. En sistemas de AMTI las algas, como productores primarios, tienen la capacidad de fijar con su desarrollo estos compuestos y mejorar la calidad de las aguas provenientes del cultivo de otros organismos propios de niveles tróficos superiores, reduciendo el impacto ambiental producido por los efluentes que llegan al ecosistema (Kang *et al.*, 2013); es decir, la integración de organismos, además de diversificar la acuicultura, puede reducir sustancialmente el impacto medioambiental.

Un efluente acuícola potencial para el cultivo de macroalgas tiene unas características predeterminadas difíciles de modificar. Estas podrían ser, en algunos casos, limitantes para el cultivo de determinadas especies. Por ello, es importante saber la influencia que tiene en el cultivo de macroalga las concentraciones de nitrógeno (especialmente NO_3) y fosfatos, incluyendo, la interacción de ambos. Estos estudios son fundamentales para

poder desarrollar biofiltros (cultivos de macroalgas) eficientes y rentables. Teniendo esto en cuenta, es fundamental la selección apropiada de los géneros/especies de algas a utilizar (Neori *et al.*, 2004; Lawton *et al.*, 2013), y conocer los requerimientos nutricionales para su cultivo (Harrison & Hurd, 2001).

Numerosos estudios (Neori *et al.*, 1991; Neori, 1996; Mwandya *et al.*, 1999; Schuenhoff *et al.*, 2003; Lüning & Pang, 2003; Wang *et al.*, 2007; Bolton *et al.*, 2009; Cruz-Suárez *et al.*, 2010; Nobre *et al.*, 2010; Van Khoi & Fotedar, 2011; Thi *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2012; Macchiavello & Bulboa, 2014; Castelar *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015) indican que las especies del género *Ulva* Linnaeus son ideales para la biofiltración de los efluentes acuícolas e inclusión en los sistemas de AMTI, tanto en sistemas abiertos como de recirculación de agua (RAS). Esto se debe a que las especies de este género: i) son eurohalinas, ii) toleran altas concentraciones de nutrientes, iii) muestran una alta tasa de crecimiento y eficiencia biofiltradora y iv) son fácilmente cultivables por sencillas técnicas de propagación vegetativa. Pero no solo es interesante el uso de las especies de *Ulva* en sistemas de AMTI por su capacidad de biofiltración, también lo son por el valor y potencialidad de uso de la biomasa obtenida en: i) la alimentación humana, debido a su alto contenido en proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas, minerales, compuestos bioactivos (antioxidantes, antibacteriales, antivirales, anticancerígenos, etc.) y bajo en lípidos (Plaza *et al.*, 2008), ii) la alimentación en acuicultura, lo que permite formular piensos menos grasos y con tasas de aceptación más altas (Valente *et al.*, 2006; Vizcaíno *et al.*, 2015), iii) la creación de nuevos materiales como biocauchos (Carrasco, 2008) o iv) la generación de biocombustibles (Montingelli *et al.*, 2015); entre otras aplicaciones. En los sistemas de recirculación de agua pueden tener además un importante papel en la reducción de costes operacionales debido a una mayor reutilización del agua.

El equipo de investigación en Biología Costera (BioCost) de la Universidad de A Coruña lleva ya varios años trabajando dentro del proyecto de investigación “IntegRAS”: “Optimización del diseño y manejo de sistemas de cultivo multitróficos en recirculación peces-macroalgas (AGL2013-41868-R)”, financiado por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 (MINECO), en la optimización del cultivo de distintas especies de *Ulva* para su integración en cultivos de lenguado (*Solea senegalensis*) en sistemas en tierra con recirculación de agua (IMTA-RAS). Estos estudios han concluido que por razones tanto de productividad, capacidad

de biofiltración y valor de la biomasa obtenida la especie *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada es la idónea para su uso como biofiltro en estos sistemas (Casais & Couce, 2016) por lo que este trabajo pretende profundizar en algunos aspectos del cultivo de esta especie con vistas a su futura optimización.

3 Objetivo

El objetivo principal de este estudio es conocer el efecto que tienen las distintas concentraciones de nitratos y fosfatos en el crecimiento, la capacidad biofiltradora y la calidad de la biomasa de *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada para determinar las concentraciones óptimas de estos macronutrientes en un cultivo en sistema AMTI en recirculación.

4 Material y métodos

4.1 La especie estudiada

La especie utilizada para el estudio fue *Ulva ohnoi* Hiraoka & Shimada (Ulvales, Chlorophyta). Se trata de una especie con distribución meridional (aguas cálidas y alta intensidad lumínica), que se caracteriza por presentar talos laminares diestromáticos de color verde brillante con brillo metálico y de forma orbicular, ovada u obovada, en ocasiones irregular, que se fijan al sustrato mediante un pequeño disco. El grosor de la lámina varía entre 30 y 55 μm en la zona apical-media y entre 80 y 90 μm en la zona basal. La lámina suele presentar márgenes lisos, en ocasiones con pequeñas protuberancias originadas por grandes células voluminosas o, incluso, prolongaciones celulares macroscópicas a modo de dientes o espinas romas. En visión superficial las células son poligonales o cuadrangulares con 1 a 3 pirenoides por célula (Hiraoka *et al.*, 2004).

La identificación de la especie se realizó en base a sus características morfológicas y moleculares (*rbcL* barcode). Este análisis molecular imprescindible para confirmar la correcta identificación específica fue realizado por la empresa *spin-off* de la UDC AllGenetics ubicada en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), donde este estudio fue también llevado a cabo.



Figura 1: Ejemplar silvestre de *Ulva ohnoi* (San Fernando, Cádiz).

4.2 Determinación de la tasa de crecimiento, la tasa de asimilación y la eficiencia de biofiltración

- El cálculo de la tasa de crecimiento ($\% d^{-1}$) se realizó mediante la ecuación:

$$\text{Tasa de crecimiento} = [100 \times \text{Ln} (\text{peso húmedo final}/\text{peso húmedo inicial})] / \text{tiempo}$$

El peso húmedo se determinó mediante una báscula de precisión RadWag Ps600.R2. Antes del pesado se secó la biomasa con papel de filtro para retirar la película de agua de la superficie del talo.

-La tasa de asimilación ($\text{mg l}^{-1} \text{ t}^{-1}$) se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Tasa de asimilación (RR)} = (\text{concentración inicial} - \text{concentración final}) / \text{tiempo}$$

- La eficiencia de biofiltración (%) se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Eficiencia de biofiltración (RE)} = [(\text{conc. inicial} - \text{conc. final}) / \text{conc inicial}] \times 100$$

4.3 Determinación de nitratos y fosfatos

El análisis de nitratos (N) y fosfatos (P) se realizó con un espectrofotómetro HP 8433 UV-Visible.

Para la determinación de los nitratos se usó el método APHA (1992). Este método se basa en la lectura de absorbancia del ión nitrato a 220 nm.

Para la determinación del fosfato se usó el método de Grasshoff *et al.*, (1999), método colorimétrico que se basa en la reducción y unión del molibdeno y fosfato, y su lectura de absorbancia a 880 nm.

Todas las muestras fueron filtradas a 45 μm antes de su análisis.



Figura 2: Espectrofotómetro (izquierda); Instrumental para la determinación de fosfato (derecha).

4.4 Composición química de carbono, nitrógeno, hidrógeno, proteínas y relación carbono/nitrógeno

Los análisis de composición química se realizaron a partir de la biomasa obtenida en las distintas condiciones experimentales al final de la experiencia. La biomasa se secó 24 horas a 45 °C. Posteriormente se homogenizó la biomasa para obtener una muestra media representativa de la misma. Los análisis fueron realizados por la Unidad de Análisis Elemental de los SAI de la UDC.

Para la determinación del contenido en proteínas se empleó el siguiente factor de conversión (Angell *et al.*, 2016):

$$\text{Proteínas (\%)} = \% \text{ N} \times 6,25$$

4.5 Medios de cultivo

El medio de cultivo del *stock* consistió en agua de mar enriquecida con 20 partes por millón (ppm) de nitrato (NaNO_3), 0,5 ppm de fosfato (NaH_2PO_4) y oligoelementos (Tabla 1):

Tabla 1. Composición química de la solución de oligoelementos.

	g l^{-1}
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	14
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,6
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
NaOH (para evitar formación de precipitados)	2 perlas

Los medios de cultivo utilizados para las experiencias bifactoriales en cámara consistieron en agua marina artificial preparada con agua dulce filtrada a $20\ \mu\text{m}$ y la correspondiente cantidad de sales comerciales Instant Ocean[®] usadas en acuariología marina, hasta una salinidad final de 34%. Las concentraciones utilizadas se resumen en la tabla 2 (4.7.1).

4.6 Cultivo *stock*

El *stock* de *U. ohnoi* utilizado para las experiencias se mantuvo en suspensión en 100 l de medio de cultivo en un tanque de 180 l (Figura 3), con aireación constante, temperatura de $18 \pm 1,5\ ^\circ\text{C}$ y con ciclo de luz:oscuridad 12:12 horas. La salinidad se mantuvo a 34%, compensando las pérdidas de evaporización con agua dulce.



Figura 3: Tanque de cultivo del *stock* de *Ulva ohnoi* usado en las experiencias.

4.7 Diseño experimental

4.7.1 Diseño de la experiencia bifactorial

Todas las experiencias bifactoriales para el estudio de la influencia de los niveles de N y P en el desarrollo de *U. ohnoi* se realizaron utilizando placas de seis pocillos para cultivos celulares marca Falcon de 10 ml mantenidas en una cámara de cultivo Liebherr a una temperatura de 18 ± 0.2 °C, iluminación de 300 ± 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mediante paneles led Samsung VT-1422 (6.400 °K), fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 y una agitación de 50 rpm mediante un agitador Skyline shaker Dos-20L.

Como material de partida en todas las experiencias se usaron 24 discos de 2 cm de diámetro de láminas de ejemplares de *U. ohnoi* procedentes del *stock*. Estos discos fueron obtenidos mediante la perforación de la lámina de los ejemplares con un sacabocados de ese diámetro. Los discos fueron pesados en fresco (tras su secado por contacto con papel de filtro) y sometidos a un periodo de aclimatación de 72 h bajo las mismas condiciones de nutrientes que el *stock* y sin renovación del medio. Después de este período de aclimatación los discos se volvían a pesar para seleccionar los 12 discos más parecidos en peso que serían los usados en las experiencias bifactoriales. Esta forma de proceder tuvo por objeto disminuir en la medida de lo posible la variabilidad

de la tasa de crecimiento de los discos debida a la zona de la lámina y ejemplar de procedencia o la propia variabilidad interindividual. Para comenzar las experiencias se procedía a recortar los discos seleccionados nuevamente al tamaño de 2 cm de diámetro.



Figura 4: Placas de cultivo en la cámara de incubación durante una de las experiencias.

El estudio de los efectos de la concentración de nitrato y fosfato sobre el cultivo de *U. ohnoi* se realizó mediante un plan bifactorial ortogonal, estableciéndose una matriz de nueve combinaciones (niveles). Este diseño experimental posibilitó estudiar los efectos principales y las posibles interacciones de los factores de estudio.

El diseño de la matriz se resume en la tabla 2. Se dispuso una réplica para todos los niveles ($n = 1$) a excepción del centro de la matriz, en el cual se estableció un $n = 4$, cuya varianza se asumió como la varianza experimental para los restantes niveles.

Tabla 2: Esquema y codificación de niveles de la matriz.

	Códigos	Valores	
		N (mg l ⁻¹)	P (mg l ⁻¹)
	-1	2	0,2
	0	42	0,6
	1	82	1
Incrementos	1	40	0,4

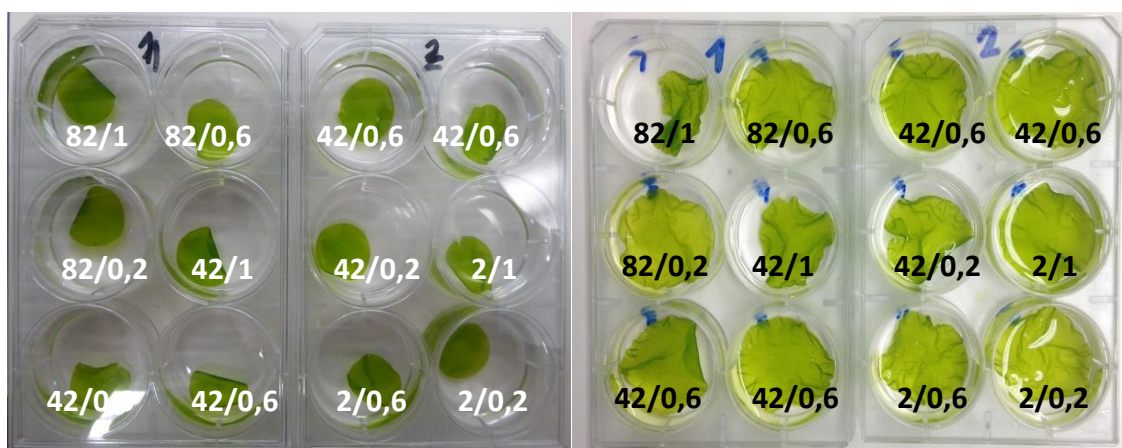


Figura 5: Distribución de los niveles experimentales en las placas al inicio y final de una experiencia y concentraciones (mg l⁻¹) de nitrato/fosfato.

La experiencia bifactorial consistió en dos estudios de once días de duración, los tres primeros días sirvieron para la aclimatación y selección inicial de los discos, mientras que en los restantes días se establecieron las condiciones experimentales descritas anteriormente (Tabla 2), renovándose el medio diariamente. Al igual que en las experiencias piloto, tras el periodo de aclimatación se volvieron a recortar los discos seleccionados a 2 cm. Se determinó el peso húmedo final y el consumo de nitrato diariamente, y el contenido de carbono, nitrógeno, hidrógeno y proteínas al final de cada estudio para todos los niveles.

Todas las muestras fueron congeladas para su posterior análisis.

4.7.2 Diseño de la experiencia de viabilidad de propágulos

Las experiencias anteriores acabaron a los 11 días de cultivo porque tras ese período las láminas de *U. ohnoi*, sobre todo en las condiciones extremas, perdían su consistencia y

se fragmentaban con tanta facilidad que resultaba imposible seguir con la experiencia. De todas formas se realizó un estudio para ver si estos fragmentos podrían seguir siendo viables en otras condiciones de cultivo por las repercusiones biológicas o utilidad que ello podría tener, por ejemplo, para su utilización como inóculo de cultivo.

Para ello se cultivaron los fragmentos obtenidos en tres condiciones diferentes de fragmentación (baja, media y alta) en botellones de 1 l, en las mismas condiciones de cultivo en cámara: 20 ppm de nitrato, 0.05 ppm de fosfato, oligoelementos y fotoperiodo luz:oscuridad 12:12; con una temperatura de 16 °C y aireación constante. Se realizó una renovación del medio a los 20 días.

Para conocer la tasa de crecimiento medio de los fragmentos se seleccionaron al azar 15 de los fragmentos más grandes de tres condiciones diferentes de N y P según la tabla 2: (-1,-1), (0,0) y (1,1), que fueron pesados al inicio y al final de la experiencia (43 días) para el cálculo final de su tasa de crecimiento.

4.8 Análisis estadístico

El tratamiento de los datos se realizó usando el programa estadístico R versión 3.3.3., mientras que las gráficas fueron obtenidas usando los programas R versión 3.3.3 y Microsoft Excel.

Para todos los parámetros analizados se calcularon las medias y las desviaciones estándar.

Para el modelo lineal de la experiencia bifactorial se estima los coeficientes de efectos principales e interacción para la superficie de respuesta mediante un test-t a un nivel de significación del 95 % (p-valor < 0,05). El contraste de regresión del modelo lineal se realiza mediante tabla ANOVA a un nivel de significación del 95 % (p-valor < 0,05). Se estima la variabilidad total explicada por el modelo lineal mediante el coeficiente de determinación (R^2).

Para el test final y experiencia factorial, la hipótesis de que la tasa de crecimiento no es diferente entre las distintas semanas se analiza mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95 % (p-valor > 0,05).

5 Resultados

5.1 Experiencia bifactorial

5.1.1 Tasas de crecimiento

Los resultados de las dos experiencias mostraron que la tasa de crecimiento media (calculada a partir de todas las tasas de crecimiento de todos los niveles factoriales del período experimental) presentaron diferencias significativas (p -valor $< 0,05$). Por ello, se decidió incluir un efecto temporal “período” en la elaboración del modelo lineal (Figura 6)

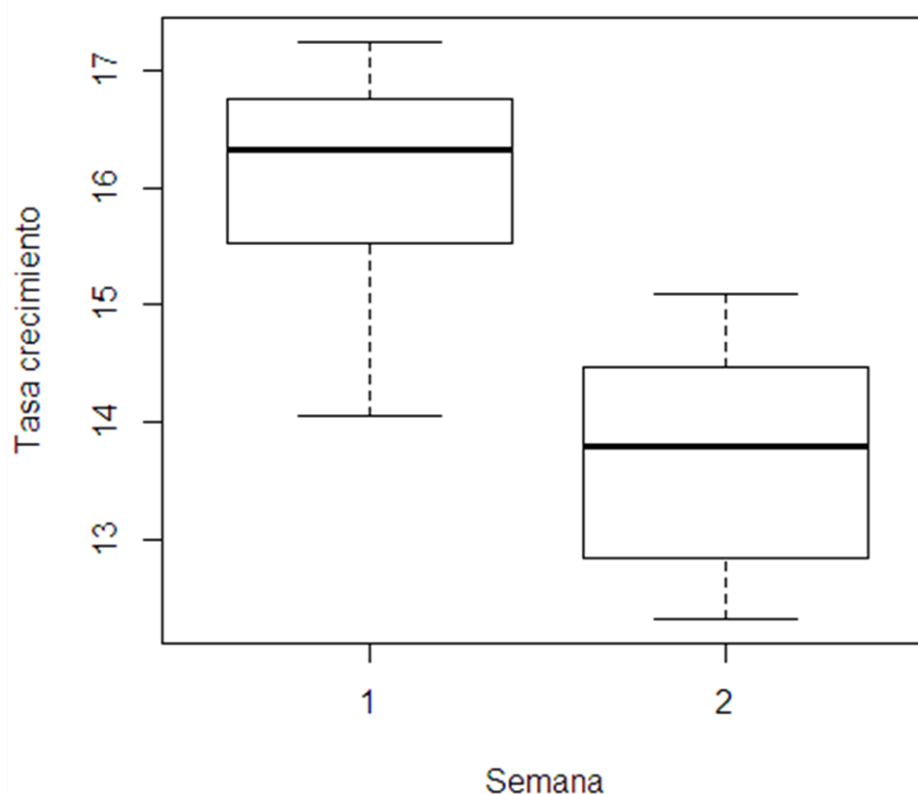


Figura 6: Diagrama de cajas y bigotes de las tasas de crecimiento ($\% d^{-1}$) de las dos experiencias.

Las tasas de crecimiento de las distintas combinaciones factoriales fueron significativamente distintas (p -valor $< 0,05$) debido al efecto principal de la concentración de fosfatos, al efecto interacción fosfatos-nitratos y al efecto principal “período”semana, como se indica en el siguiente modelo:

$$\text{Tasa de crecimiento} = 14,23 - 1,56[P] - 4,27[N]^2[P] + 4,98 \text{ período}$$

Este modelo permitió determinar que: al aumentar la concentración de fosfato se produce una ligera reducción de la tasa de crecimiento de *U. ohnoi*, mientras que la interacción de la concentración de fosfato y nitratos nos indica que el nitrato muestra una dinámica parabólica (curva de óptimo) reduciendo el efecto negativo del fosfato en las concentraciones medias (42 mg l^{-1}) de nitrato y, como ya se ha expuesto, un importante efecto debido al período concreto en que se realizó cada experiencia en la tasa de crecimiento; explicándose un 85 % de la varianza de la tasa de crecimiento ($R^2 = 0,85$).

En la figura 7 se puede ver la superficie de respuesta empleada para estimar el modelo lineal. Los mayores crecimientos se obtuvieron en el centro de la matriz (0,0).

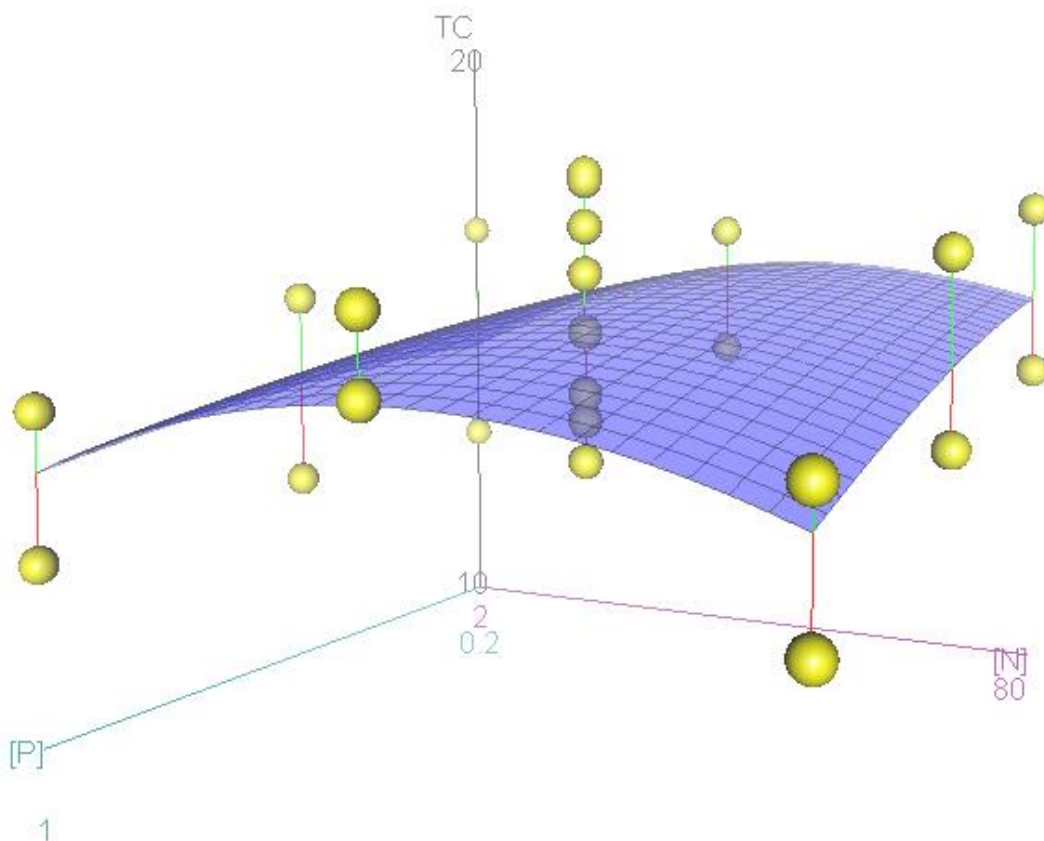


Figura 7: Gráfica de superficie 3D de la tasa de crecimiento (TC) en $\% \text{ d}^{-1}$ y las distintas concentraciones de nitratos ([N]) y fosfatos ([P]) en mg l^{-1} .

5.1.2 Tasa de asimilación (RR) y eficiencia de biofiltración (RE)

En las siguientes tablas 3 y 4 se puede observar que la mayor tasa de asimilación de nitrato fue en los niveles superiores de nitrato (82 mg l^{-1}) y las menores en los niveles

menores (2 mg l^{-1}), mientras que la mayor eficiencia de biofiltración fue a las concentraciones más bajas de nitrato (2 mg l^{-1}). En la tabla 4 se muestran las densidades iniciales y finales que alcanzaron los cultivos en los distintos niveles experimentales.

Tabla 3. Tasas de asimilación ($\text{mg l}^{-1} \text{ t}^{-1}$) del nitrato en cada nivel experimental del estudio bifactorial.

RR				
P/N	2	42	82	
0,2	1,65	12,80	26,09	
0,6	1,67	$12,80 \pm 1,83$	22,79	
1	1,12	17,17	25,03	

Tabla 4. Eficiencia de biofiltración (%) del nitrato y densidades (kg m^{-3}) iniciales y finales (ρ_i y ρ_f) en cada nivel experimental del estudio bifactorial.

RE						
$\rho_f \text{ P} / \rho_i \text{ N}$	ρ_i	2	ρ_i	42	ρ_i	82
0,2	2,85	82,85	2,65	30,48	2,75	31,81
ρ_f	14,5		15,00		15,25	
0,6	2,95	83,89	$2,73 \pm 0,15$	$39,32 \pm 4,35$	2,75	27,80
ρ_f	13,8		$14,98 \pm 0,85$		14,30	
1	3,05	55,97	2,70	40,87	2,70	30,52
ρ_f	13,1		13,85		11,5	

En las figuras 8 y 9 se puede observar la evolución diaria de la tasa de asimilación y la eficiencia de biofiltración de nitrato en las dos experiencias bifactoriales. Como era de esperar al aumentar la concentración de nitrato en el medio, *U. ohnoi* aumenta su capacidad de asimilación, mientras que al reducir las concentraciones de nitrato en el medio aumenta su eficiencia de biofiltración.

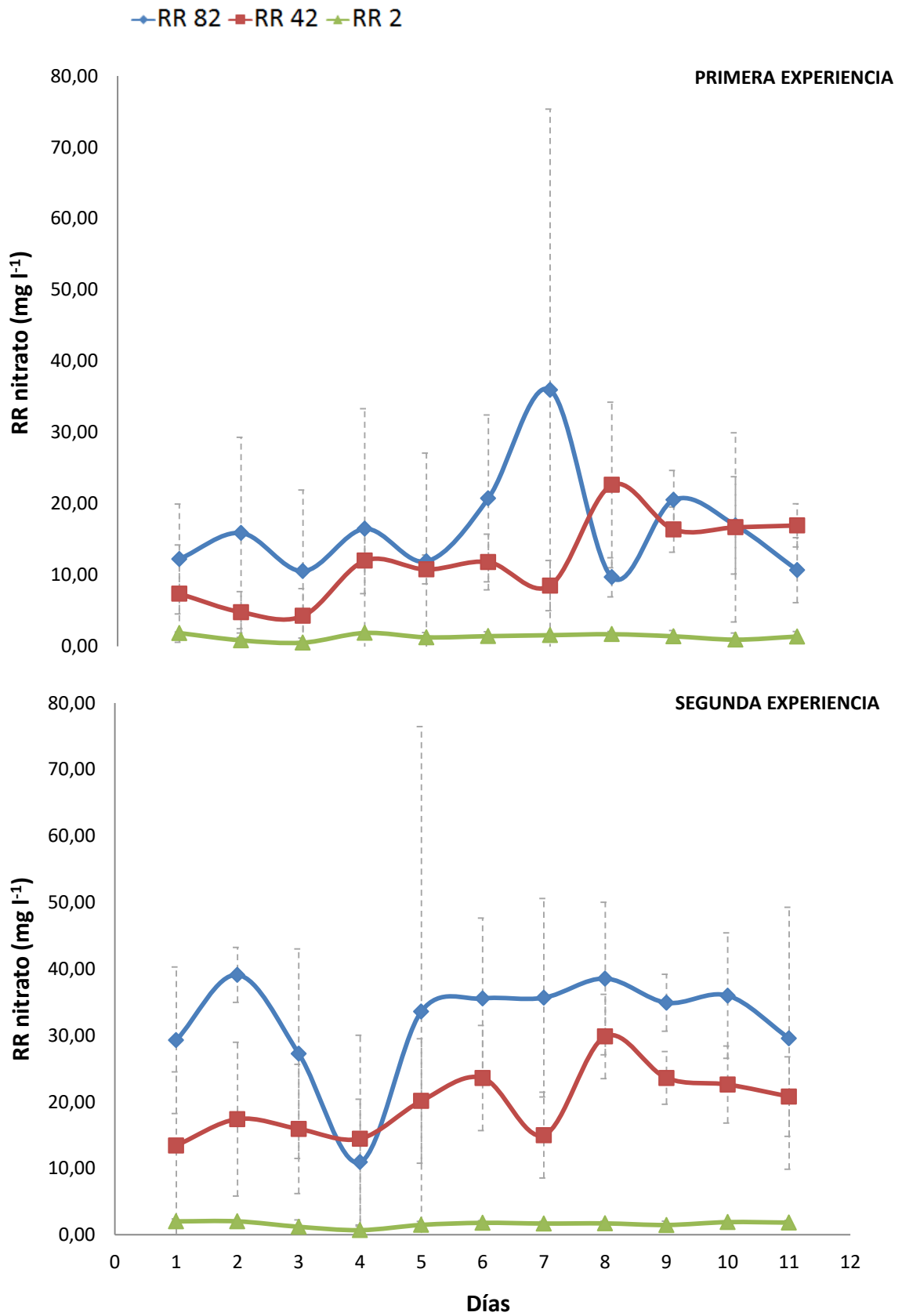


Figura 8: Tasas de asimilación diaria de nitrato (RR) para las tres concentraciones estudiadas (82, 42 y 2 mg l⁻¹).

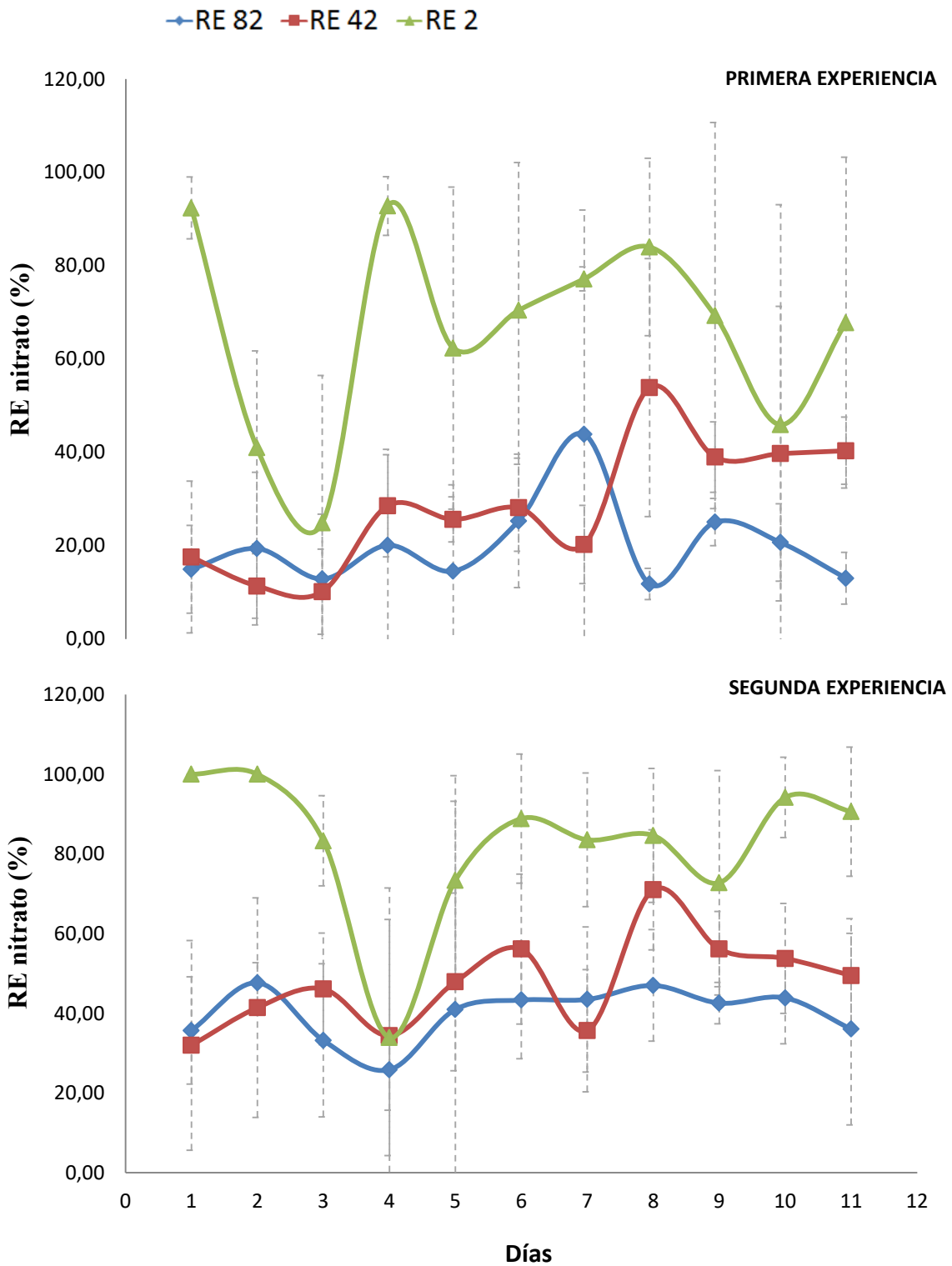


Figura 9: Eficiencia de biofiltración diaria de nitrato (RE) para las tres concentraciones estudiadas (82, 42 y 2 mg l⁻¹).

5.1.3 Composición química de carbono, nitrógeno, hidrogeno, proteínas y relación carbono/nitrógeno

Los análisis de carbono, nitrógeno, hidrogeno y proteínas mostraron que los mayores contenidos en proteínas se dieron en el centro de la matriz (donde el crecimiento fue mayor) y que todos fueron superiores al 20% a excepción del nivel (-1,1). La mayor relación C/N se obtuvo en ese mismo nivel (Tabla 5).

Tabla 5: Contenido (%) en carbono, nitrógeno, hidrogeno, relación carbono/nitrógeno (C/N) y proteínas en *U. ohnoi* procedente del *stock* inicial y al final del estudio bifactorial en los niveles (1,-1), (0,0) y (-1,1).

	C (%)	N (%)	H (%)	C/N	Proteínas (%)
STOCK	31,37	3,39	5,16	9,26	21,2
82/0,2	27,08	3,42	4,59	7,93	21,38
42/0,6	26,73	3,57	5	7,49	22,34
2/1	28,76	2,76	5,52	10,43	17,25

5.2 Experiencia de viabilidad de propágulos

Tras 43 días de cultivo se observó que las algas procedentes del nivel (82/1), que tenían un mayor grado de fragmentación inicial sin duda por el efecto “tóxico” del fosfato, sorprendentemente presentaron mayor tasa de crecimiento que las procedentes de concentraciones intermedias y bajas de estos elementos y que presentaron un menor grado de fragmentación (Figura 10).



Figura 10: Botellones con biomasa procedente de la experiencia final, se observan de izq. a dcha. mayor a menor concentración de nutrientes [N/P]: 82/1, 42/0,6, 2/0,2 respectivamente. Se observó mayor tasa de crecimiento en la de mayor concentración de ambos elementos.

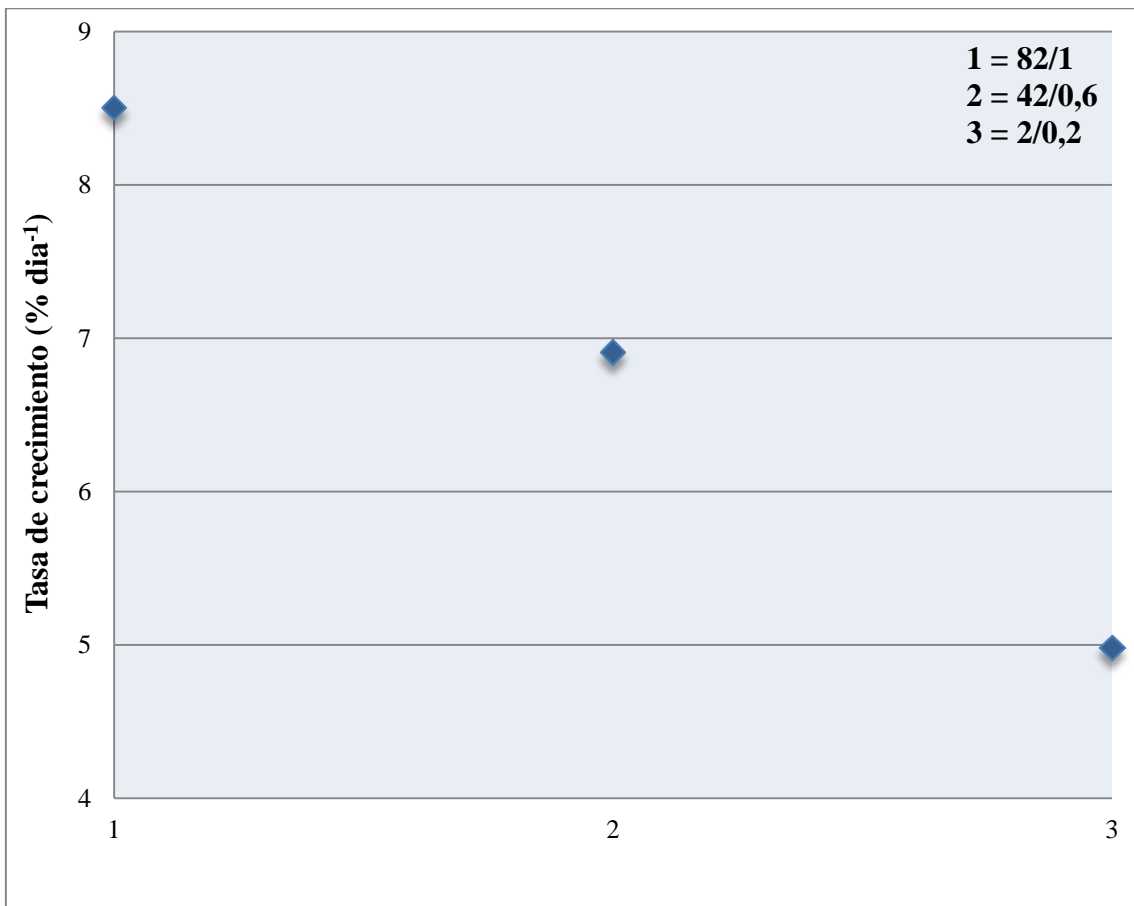


Figura 11: Tasa de crecimiento media y desviación estándar (% d⁻¹) en cada uno de los botellones tras el período de cultivo en cámara.

6 Discusión

La modificación de las concentraciones de nutrientes es posible en los cultivos de macroalgas destinados únicamente a la producción de biomasa, lo que permite en la mayoría de los casos controlar la tasa de crecimiento, la productividad, la cantidad de ciertos productos formados por ellas, etc. (Harrison & Hurd 2001). Sin embargo, los efluentes acuícolas utilizables como medio de cultivo de macroalgas presentan unas características químicas predeterminadas sobre las que va a ser difícil actuar, en particular su relación N/P. Estas características podrían ser en algunos casos limitantes para el desarrollo de determinadas especies, en este caso para *Ulva ohnoi*. Es por ello que en este trabajo se ha testado bajo un diseño bifactorial si diferentes concentraciones de nitratos y fosfatos afectaban de forma significativa a las tasas de crecimiento de esta especie.

La concentración de nutrientes y la luz, son los factores clave que pueden determinar la densidad de cultivo y la productividad en los sistemas acuícolas (Harrison & Hurd 2001). En las experiencias realizadas por Malta & Verschuure (1997) queda de manifiesto que la cantidad de P presente en el agua y la luz, explicaban gran parte de la variabilidad en el ratio de crecimiento de *Ulva* spp. Por otra parte los trabajos realizados por Villares *et al.*, (1999), Buschmann *et al.*, (2004), Harrison & Hurd (2001), Hernández *et al.* (2008) concluyen que el fosfato tiene un papel más importante que el nitrato sobre el crecimiento/producción de *Ulva* spp. En dichos trabajos también se describe que existe una leve interacción entre ambos nutrientes. Por otro lado la relación N:P del tejido del alga puede controlar su eficiencia de biofiltración debido a que este ratio regula la tasa de asimilación para mantener la proporción en su nivel óptimo (Harrison & Hurd 2001).

Los resultados obtenidos en nuestras experiencias bifactoriales con nitratos y fosfatos mostraron diferencias estadísticamente significativas sobre las tasas de crecimiento debido a las distintas concentraciones de dichos nutrientes. Las tasas de crecimiento variaron entorno al 10 – 20 % día⁻¹ en todas las experiencias realizadas, lo que se encuentra dentro del rango de valores observados por Neori *et al.* (1991), Lüning *et al.* (2008), Luo *et al.* (2012) y Casais & Couce (2016) para distintas especies del género *Ulva*. En este diseño bifactorial se observa que las mayores tasas de crecimiento se

obtuvieron en aquellas unidades experimentales que fueron sometidas a las concentraciones medias (42 ppm) de N y medias (0.6 ppm) de P. Por otra parte se observa que sobrepasado un límite el P tiene un efecto claramente inhibitor sobre la tasa de crecimiento, efecto que solo se ve un poco atenuado en condiciones óptimas de concentración de nitrógeno; es decir, que como ya indicaron otros autores anteriormente (Buschmann *et al.*, 2004; Harrison & Hurd, 2001; Hernández *et al.*, 2008) parece existir una ligera interacción entre ambos nutrientes, interacción que en nuestro caso se traduce en una pequeña limitación del grado de toxicidad del P por parte del N.

En nuestras dos experiencias se observó una variabilidad temporal que afecta de forma significativa a las tasas de crecimiento, y por tanto, a las tasas de asimilación y la eficiencia de biofiltración. Estos resultados nos hacen pensar que posiblemente el ciclo lunar y/o el ciclo mareal puedan afectar a dichos parámetros. Por ello, se procedió a aplicar el factor “período” a la hora de realizar el modelo de regresión que explica los datos obtenidos en dichas experiencias. Éste factor incorporado al modelo junto con los otros dos factores estudiados (N y P), permiten explicar en torno al 85% de la variabilidad observada.

En nuestro caso, en el centro de la matriz, se observaron absorciones medias del 39,32% \pm 6,07 para el N inorgánico disuelto en el agua, siendo gran parte de la variabilidad de este dato debida a las diferencias temporales entre ambas experiencias. Estos datos se acercan bastante a los obtenidos por Bartoli *et al.* (2005), quienes observaron que *Ulva* sp. era capaz de retirar en torno al 50% del N inorgánico disuelto presente en los efluentes y a los obtenidos por Hernández *et al.* (2005) que indican una retirada del 54% y de N en *Ulva rotundata*. Otros autores sin embargo describen cifras mucho más altas; así Mwandya *et al.* (1999) observaron cómo *U. reticulata* era capaz de retirar el 63% del N, Wang *et al.* (2007) observaron cómo *Ulva pertusa* (*U. australis*) era capaz de retirar el 68% del N, o Van Khoi & Fotedar (2011) que observaron cómo *Ulva lactuca* era capaz de retirar en torno al 59 – 89% del N inorgánico disuelto presente en efluentes de acuicultura. De todas formas, en nuestra experiencia las mayores tasas de bioacumulación de nitrato se observaron como era de esperar en los niveles superiores (82 mg l⁻¹) y las menores en los niveles de menor concentración (2 mg l⁻¹), por contra, la eficiencia de biofiltración fue en el sentido contrario, siendo mayor en las concentraciones menores (2 mg l⁻¹). Por lo tanto, al aumentar la concentración de nitrato

en el medio, *U. ohnoi* aumenta su capacidad de bioacumulación, mientras que al reducirla aumenta su eficiencia de biofiltración.

La mayoría de las algas pueden ajustar las tasas de absorción en función de la concentración del nutriente en el medio mediante diferentes mecanismos como los descritos por Fiedlander & Dawes (1985) o Martínez & Rico (2004). Además, bajo condiciones de exceso de nutrientes las algas presentan la capacidad de almacenarlos y así poder usarlos para mantener las tasas de crecimiento cuando el nivel de éstos en el medio se vuelve limitante (Harrison & Hurd, 2001). Atendiendo a ello, y observando los resultados obtenidos tras el cultivo de los fragmentos generados durante la última experiencia de cultivo, hipotetizamos que debe existir algún mecanismo endógeno que provoque la debilitación de la pared de celular cuando los individuos se encuentran bajo condiciones de elevada concentración de nutrientes, especialmente P, lo que ayudaría a su dispersión por fragmentación. La explicación biológica de este efecto podría ser que de estos fragmentos podrían actuar como propágulos o diásporas que una vez dispersados por las corrientes podrían ser capaces de utilizar las reservas almacenadas y presentar tasas de crecimiento más elevadas que otros individuos sin dicho “almacén de reserva”.

7 Conclusiones

Observando los resultados obtenidos, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Las mayores tasas de crecimiento y mayores contenidos en proteínas se dieron en las concentraciones intermedias de nitratos y fosfatos, i.e. 42/0,6.
- El período experimental afecta de forma significativa a las tasas de crecimiento y, por tanto, a la eficiencia de biofiltración de *Ulva ohnoi*. Ello hace pensar que el ciclo lunar y/o mareal pueda ser el responsable de dicho efecto.
- El fosfato es un elemento esencial para el crecimiento de las especies de macroalgas, pero un aporte elevado del mismo puede resultar “tóxico”.
- Dado el margen de tolerancia en las concentraciones de nitrato para el crecimiento de *U. ohnoi* la relación nitrato/fosfato de los efluentes de cultivo no va a ser un factor limitante para su empleo en el cultivo de esta especie.

- Se establece la siguiente hipótesis: El comportamiento de los individuos bajo condiciones extremas de nutrientes pueden ser parte de un mecanismo de propagación vegetativa.
- Estudios futuros deberán determinar de una forma más eficiente el posible efecto del ciclo lunar y/o mareal sobre las tasas de crecimiento.

8 Referencias bibliográficas

- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., and Paul, N. A. 2016. The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), pp.511–524.
- APHA, 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Edition, American Public Health Association (APHA), *American Water Works Association (AWWA) and Water Pollution Control Federation (WPCF)*, Washington DC. , pp.1–4.
- Bartoli, M., Nizzoli, D., Naldi, M., Vezzulli, L., Porrello, S., Lenzi, M., Viaroli, P. 2005. Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): Denitrification versus *Ulva* uptake. *Marine Pollution Bulletin*, 50(11), pp.1386–1397.
- Bolton, J.J., Robertson-Andersson, D. V., Shuuluka, D., Kandjengi, L. 2009. Growing *ulva* (chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South africa: A swot analysis. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), pp.575–583.
- Buschmann, A.H. 2004. Experimental indoor cultivation of the carrageenophytic red alga *Gigartina skottsbergii*. *Aquaculture*, 241(1–4), pp.357–370.
- Carrasco F. 2008. Biocauchos que nacen en el mar. Informe de proyecto.
- Casais & Couce, 2016. Desarrollo de cultivos de *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de acuicultura multitrófica integrada (AMTI). *Algas, Boletín Informativo de la Sociedad Española de Ficología*, 52, pp.36–39.
- Castelar, B., Pontes, M. D., Costa, W., Moura, L. C., Dias, G. E., Landuci, F. S., Reis, R. P. 2015. Biofiltering efficiency and productive performance of macroalgae with potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Boletim do Instituto de Pesca*, 41, pp.763–770.
- Cruz-Suárez, L.E., León, A., Peña-Rodríguez, A., Rodríguez-Peña, G., Moll, B., Ricque-Marie, D. 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture*, 301(1–4), pp.64–68.
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. *Contribución a la Seguridad Alimentaria y La Nutrición Para Todos*. Roma, 224.
- Fiedlander, & Dawes., 1985. In situ uptake kinetics of ammonium and phosphate and chemical composition of the red seaweed *Gracilaria tikvahiae* *Journal of Phycology*, 21, pp.448-453.
- Grasshoff, K., 1999. Methods of Seawater Analysis L. Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrardt, M., Anderson, ed., Wiley-vch.
- Guerrero, S. & J. Cremades (eds.) (2012). *Acuicultura Multitrófica Integrada. Una alternativa sostenible y de futuro para los cultivos marinos de Galicia*. Edita: XUNTA DE GALICIA, Consellería do Medio Rural e do Mar, Centro de Investigacións Mariñas. Vilanova de Arousa (Pontevedra),
- Harrison, P.J. & Hurd, C.L., 2001. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to

- aquaculture. *Cahiers de Biologie Marine*, 42(1–2), pp.71–82.
- Hernández, I., Fernández-Engo, M. A., Pérez-Lloréns, J. L., Vergara, J. J. 2005. Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus aurata* waste waters. *Journal of Applied Phycology*, 17(6), pp.557–567.
- Hernández, I., Pérez-Pastor, A., Mateo, J. J., Megina, C., Vergara, J. J. 2008. Growth dynamics of *Ulva rotundata* (Chlorophyta) in a fish farm: Implications for biomitigation at a large scale. *Journal of Phycology*, 44(4), pp.1080–1089.
- Hiraokaa M., Shimada, S., Uenosono, M., Masuda, M. 2003. A new Green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. nov. (Ulvales, Ulvophyceae) from Japan. *Phycological Research*, (51), pp. 17-29.
- Kang, Y.H., Hwang, J. R., Ching, I. K., Park, S. R. 2013. Development of a seaweed species-selection index for successful culture in a seaweed-based integrated aquaculture system. *Journal of Ocean University of China*, 12(1), pp.125–133.
- Lawton, R. J., Mata, L., Rocky de Nys, L. M., Paul, N. A. 2013. Algal Bioremediation of Waste Waters from Land-Based Aquaculture Using *Ulva*: Selecting Target Species and Strains. *PLoS ONE*, 8(10).
- Liu, F., Pang, S., Chopin, T., Gao, S., Shan, T., Zhao, X., Li, J. 2013. Understanding the recurrent large-scale green tide in the Yellow Sea: Temporal and spatial correlations between multiple geographical, aquacultural and biological factors. *Marine Environmental Research*, 83, pp.38–47.
- Lüning, K. & Pang, S., 2003. Mass Cultivation of Seaweed: Current Aspects and Approaches. *Journal of Applied Phycology*, 15(2–3), pp.115–119.
- Lüning, K., Kadel, P. & Pang, S., 2008. Control of reproduction rhythmicity by environmental and endogenous signals in *Ulva pseudocurvata* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 44(4), pp.866–873.
- Luo, M.B., Liu, F. & Xu, Z.L., 2012. Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*. *Aquatic Botany*, 100, pp.18–24.
- Macchiavello, J. & Bulboa, C., 2014. Nutrient uptake efficiency of *Gracilaria chilensis* and *Ulva lactuca* in an IMTA system with the red abalone *Haliotis rufescens*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(3), pp.523–533.
- Malta, E.-J. & Verschuure, J.M., 1997. Effects of environmental variables on between-year variation of *Ulva* growth and biomass in a eutrophic brackish lake. *Journal of Sea Research*, 38(97), pp.71–84.
- Marinho, G., Nunes, C., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Rema, P., Valente, L. M. P. 2013. The IMTA-cultivated Chlorophyta *Ulva* spp. as a sustainable ingredient in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), pp.1359–1367.
- Martínez, B. & Rico, J.M., 2004. Inorganic nitrogen and phosphorus uptake kinetics in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 40(4), pp.642–650.
- Mwandya, A. W., Mtolera, M. S. P., Pratap, H. B., Jiddawi, N. S. 1999. Macroalgae as biofilters of dissolved inorganic nutrients in an integrated mariculture tank system in Zanzibar. *Wiomsa*, pp.159–170.
- Montingelli M. E., Tedesco S. & Olabi A. G. (2015) Biogas production from algal biomass: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 43: 961-972.
- Neori, A., 1996. The type of N-supply (ammonia or nitrate) determines the performance of seaweed biofilters integrated with intensive fish culture. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 48(1), pp.19–27.
- Neori, A., Cohen, I. & Gordin, H., 1991. *Ulva lactuca* biofilter for marine fishpond effluents: II. Growth rate, yield and C:N ratio. *Botanica Marina*, 34, pp.389–398.

- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A. H., Kraemer, G. P., Halling, C., Shpigel, M., Yarish, C. 2004. Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231(1–4), pp.361–391.
- Nobre, A. M., Robertson-Andersson, D., Neori, A., Sankar, K. 2010. Ecological-economic assessment of aquaculture options: Comparison between abalone monoculture and integrated multi-trophic aquaculture of abalone and seaweeds. *Aquaculture*, 306(1–4), pp.116–126.
- Plaza M., Cifuentes A. & Ibáñez E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 31–39.
- Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F. E., Neori, A. 2003. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture*, 221(1–4), pp.167–181.
- Silva, D. M., Valente, L. M. P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M. A., Seixas, F., Rema, P. 2015. Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), pp.1671–1680.
- Thi, T., Mishima, Y. & Dinh, K., 2012. Potential of *Ulva* sp. in biofiltration and bioenergy production. *Journal of Vietnamese Environment*, 3(1), pp.55–59.
- Troell, M., Rönnabäck, P., Halling, C., Kautsky, N., Buschmann, A. 1999. Ecological engineering in aquaculture: Use of seaweeds for removing nutrients from intensive mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 11(1), pp.89–97.
- Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F., Pinto, I. S. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, (252), pp. 85-91.
- Van Khoi, L. & Fotedar, R., 2011. Integration of western king prawn (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) and green seaweed (*Ulva lactuca* Linnaeus, 1753) in a closed recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, 322–323, pp.201–209.
- Villares, R., Puente, X. & Carballeira, A., 1999. Nitrogen and phosphorus in *Ulva* sp. in the Galician Rias Bajas (northwest Spain): Seasonal fluctuations and influence on growth. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 15(1–4), pp.337–341.
- Vizcaíno, A. J., Mendes, S. I., Varela, J. L., Ruíz-jarabo, I., Rico, R., Figueroa, F. L., Abdala, R., Moriñigo, M. A., Mancera, J. M., Alarcón, F. J. 2015. Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research*, pp. 1-15.
- Wang, H., Liu, C., Qin, C., Cao, S., Ding, J. 2007. Using a macroalgae *Ulva pertusa* biofilter in a recirculating system for production of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquacultural Engineering*, 36(3), pp.217–224.
- Zhang, J., Kitazawa, D. & Yang, C., 2016. A numerical modeling approach to support decision-making on design of integrated multitrophic aquaculture for efficiently mitigating aquatic waste. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 21(8), pp.1247–1261.